香合欢 EST-SSR 标记开发及种间通用性研究[1]

安琪[1]，冯源恒[2]，杨章旗[2]，胡拉[2]
（1. 广西师范大学 生命科学学院，广西 桂林 541006；2. 广西壮族自治区林业科学研究院 广西马尾松工程技术研究中心，广西 南宁 530002）

摘要：香合欢是我国南方特有的珍贵用材树种，对其种质资源开展群体遗传学研究，对于该树种种质资源的保护利用具有重要意义。该文根据香合欢转录组测序结果设计开发 EST-SSR 引物，并在黄豆树、南洋楹、黑木相思、格木等近缘树种中进行通用性分析研究。结果表明：所开发的 243 对引物有 171 对能够成功扩增出目的条带，在香合欢、黄豆树、南洋楹、黑木相思、格木中的有效扩增率分别为 63.79%、33.75%、45.68%、41.56%、14.81%；多态性比率分别为 23.87%、12.20%、9.01%、3.96%、2.78%；5 个物种间均通用的引物有 18 对。通过验证共获得香合欢 SSR 多态性标记 37 个，黄豆树和南洋楹多态性标记均为 10 个，黑木相思多态性标记 4 个，格木多态性标记 1 个。所开发的香合欢 EST-SSR 标记，可以满足开展香合欢群体遗传学相关研究的需要，并在黄豆树、南洋楹等近缘树种中具有较好的通用性和研究实用性。综上结果表明，EST-SSR 标记将为香合欢、黄豆树、南洋楹、黑木相思、格木等树种的种质资源遗传多样性评价、育种材料指纹图谱构建、群体交配系统分析等方面提供可靠研究工具。

关键词：香合欢，EST-SSR，分子标记，通用性，多态性
中图分类号：Q943

EST-SSR marker development and interspecific generality of *Albizzia odoratissima*

AN Qi[1], FENG Yuanheng[2], YANG Zhangqi[2], HU La[2]
（1. *College of Life Sciences , Guangxi Normal University* , Guilin 541006, Guangxi, China; 2. *Guangxi Institute of Forestry Science , Masson Pine Engineering Technology Research Center of Guangxi*, Nanning 530002, China）

Abstract: *Albizia odoratissima* is a unique rare timber tree specie in the south of China, and it is of great significance to carry out group genetics research on its germplasm resources, which is of great significance to the protection and utilization of all kinds of material resources of the tree. This study designs and develops EST-SSR markers of *Albizia odoratissima* based on the transcriptome sequencing results. In addition, *Albizia procera, Albizzia falcata, Acacia melanoxylon, Erythrophloeum fordii* and other related species were selected for analysis of interspecific generality. The results showed that among the 243 pairs of developed primers, 171 pairs could successfully amplify the target bands, and the effective amplification rate in *Albizia odoratissima Albizia procera, Albizzia falcataria, Acacia melanoxylon* and *Erythrophloeum fordii*

[1] 收稿日期：2021-01-09
基金项目：广西科技基地和人才专项（桂科 AD19254004）；广西八桂学者专项经费项目(2019A26)
[Supported by Guangxi Science and Technology Base and Special Funds for Talents(AD19254004); Special Program of Bagui Scholar(2019A26)]。
作者简介：安琪（1994-），硕士研究生，研究方向为生物化学与分子生物学，（E-mail）1920683430@qq.com。
通讯作者：杨章旗，博士，研究方向为林木遗传育种，教授级高级工程师，（E-mail）yangzhangqi@163.com。

was 63.79%, 33.75%, 45.68%, 41.56% and 14.81% respectively, and the polymorphism ratio in them was 23.87%, 12.20%, 9.01%, 3.96% and 2.78% respectively. There were 18 pairs of primers that could be commonly used among *Albizia odoratissima, A. procera, A. falcataria, Acacia melanoxylon* and *Erythrophloeum fordii*. There were 37 SSR polymorphism markers for *Albizia odoratissima* were obtained, 10 polymorphism markers for *Albizia procera* and *A. falcataria*, 4 polymorphism markers for *Acacia melanoxylon*, and there was 1 polymorphism mark of *Erythrophloeum fordii*. The developed EST-SSR markers can meet the needs of population genetic studies of *Albizia odoratissima*, and have good transferability and practicability in *Albizia procera* and *A. falcataria* and other related tree species. In conclusion, EST-SSR markers will provide a reliable research tool for genetic diversity evaluation of germplasm resources, fingerprint construction of breeding materials, and population mating system analysis of *Albizia odoratissima, A. procera, A. falcataria, Acacia melanoxylon* and *Erythrophloeum fordii*.
Key words: *Albizia odoratissima*, EST - SSR, molecular marker, transferability, polymorphism

遗传多样性作为保护生物学研究的核心内容之一，是生物经长期进化的产物。群体遗传多样性研究对于评价一个群体对环境变化的适应能力，揭示该物种生物多样性和生态系统功能的维持机制及受威胁因素，对该物种种质资源有效保护相关策略的制定至关重要(孟艺宏等，2020)。

香合欢（*Albizia odoratissima*）为豆科（Leguminosae）含羞草亚科（Mimosaceae）合欢属（*Albizia* Durazz）常绿大乔木，在我国福建、广东、广西、贵州、云南、四川、海南等省（区）均有分布（韦铄星等，2020）。香合欢具有生长迅速、出材率高、天然更新能力强等优点，是具有巨大发展潜力的高价值造林树种。此外，香合欢也具有极高的药用价值。以根入药，可用于治疗风湿关节痛、跌打损伤、创伤出血、疮癣、失眠等症状（蒋升湧，2003；蔡永敏，1996）。作为高经济价值树种，自 20 世纪 90 年代便吸引了不少学者的目光，但多集中在群落组成特征、药用价值探讨、培育栽培技术等方面，有关该树种种质资源的群体遗传学研究较少，并缺乏可用的分子标记。

除香合欢外，合欢属及其近缘树种中有许多优质的用材树种，如合欢属的黄豆树（*Albizia procera*）、金合欢属（*Acacia*）的黑木相思(*Acacia melanoxylon*)、南洋楹属（*Albizia falcataria*）的南洋楹（*Falcataria moluccana*）、以及格木属（*Erythrophleum*）的格木（*Erythrophleum fordii*）。这些树种的相关研究同样集中在栽培技术、群落组成和分布特征、药用价值研究等方面，而群体遗传学方面仍十分薄弱。目前仅金合欢属有 82 对 SSR 引物公开发表过，而合欢属、南洋楹属、格木属尚未有相关 SSR 引物的报道，从而限制了各树种分子遗传方向的深入研究。若想开展各树种遗传多样性评价、比较基因组学、基因表达图谱的构建等分子遗传方面的研究，适宜分子标记的开发势在必行。简单重复序列（Simple sequence repeats，SSR）指由 1~6 个核苷酸为重复单元串联组成的长达几十个核苷酸的重复序列，也叫微卫星标记（Microsatellite）（Tautz，1989），因其数量丰富、遍布真核生物整个基因组、多态性高、重复性好、共显性遗传、特异性强等优点被广泛应用于物种遗传多样性、遗传连锁图谱的构建、基因定位和分子标记辅助育种等研究（Powell et al.，1996）。按其来源可分为基因组 SSR(G-SSR)和表达序列标签 SSR(EST-SSR)两类。其中 G-SSR 标记基于基因组序列，其开发过程繁复、成本高、效率低；EST-SSR 是基于表达序列标签开发微卫星的一种新型分子标记，除具有 G-SSR 标记的优点外，还具有序列保守性较高，在植物物种之间通用性的优点（王丹丹和杨东霞，2017；张利达和唐克轩，2010；Preethi et al., 2020）。鉴于此，该文基于香合欢转录组测序结果开发相关分子标记。

近年来，众多研究表明，SSR 引物在物种及其近缘物种间，甚至在该物种与某些远缘物

种间均具有一定的通用性（钟敏等，2012）。 张燕梅等（2020）发现剑麻 EST-SSR 引物在龙舌兰属、丝兰麻属和中美麻属中的通用性分别为 68%、52% 和 52%。张勇等（2019）发现 66.67% 的桃 EST-SSR 引物在蔷薇科物种中扩增出多态性。方书生等（2018）发现棉花 SSR 标记在红麻中的通用性为 53.5%。可见在近缘物种间探讨 EST-SSR 引物的通用性是有效且可行的。

本研究基于香合欢转录组测序结果设计开发 EST-SSR 引物，对其在香合欢、黄豆树、黑木相思、南洋楹、格木中的通用性进行研究，将现有引物转移到黄豆树、黑木相思、南洋楹、格木等近缘树种上，既可以有效节约引物开发成本，提高引物的利用效率，还可为香合欢、黄豆树、黑木相思、南洋楹、格木及其他一些近缘物种的种质资源保护、遗传多样性等相关研究提供可靠分子标记。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取 30 份香合欢种质作为香合欢引物多态性研究的试验材料。另外选取香合欢、黄豆树、黑木相思、南洋楹、格木种质资源各 4 份，作为引物通用性研究的试验材料（表 1）。其中格木和黑木相思材料均采自南宁市林业科学研究所；4 份香合欢材料分别为广西百色市田东县地方种、广西百色市西林县地方种、海南省尖峰岭地方种、海南省霸王岭地方种；4 份南洋楹材料中 2 份采自广东省林科院树木园，2 份采自广西壮族自治区林业科学研究院；4 份黄豆树材料采自广西壮族自治区林业科学研究院。格木、黑木相思、黄豆树材料因取样地距离较近，取材较方便，采样后立即放入采样箱中，随后将样品放入-80 ℃冰箱进行保存，香合欢和南洋楹材料因取样地距离较远且取材较难，采集新鲜样品后立即放入硅胶中干燥保存。

表 1 50 份供试材料的种质信息

Table 1 Germplasm information of 50 tested materials

编号 No.	供试材料 Tested materials	种质来源地 Germplasm source
1-30	香合欢 *Albizia odoratissima*	广西百色隆林县 Baise Longlin County, Guangxi
31-34	黄豆树 *A. procera*	广西林科院 Guangxi Institute of Forestry Science
35-38	格木 *Erythrophleum fordii*	南宁市林业科学研究所 Nanning Forestry Research Institute of Guangxi
39	香合欢 *Albizia odoratissima*	广西百色田东县 Baise Tiandong County, Guangxi
40	香合欢 *A. odoratissima*	广西百色西林县 Baise xilin County, Guangxi
41	香合欢 *A. odoratissima*	海南尖峰岭 Jianfengling, Hainan Island
42	香合欢 *A. odoratissima*	海南霸王岭 Bawangling, Hainan Island
43-44	南洋楹 *Falcataria moluccana*	广东林科院树木园 Tree Garden of Guangdong Academy of Forestry
45-46	南洋楹 *Falcataria moluccana*	广西林科院 Guangxi Institute of Forestry Science

47-50	黑木相思 *Acacia melanoxylon*	南宁市林业科学研究所 Nanning Forestry Research Institute of Guangxi

1.2 SSR 标记开发

对香合欢叶子进行转录组测序，根据测序结果，使用 Novofinder 软件对香合欢转录组 38 107 条 Unigene 中的 SSR 位点进行搜索，筛选的标准是三至五核苷酸重复基元的次数为 5 次或大于 5 次；序列长度的范围为 18～26 bp。引物均由广州艾基生物技术有限公司合成。

1.3 DNA 提取

植物基因组 DNA 的提取是使用液氮将香合欢及其近缘物种的叶片研磨成粉末状，采用 Ezup 柱式植物基因组 DNA 抽提试剂盒提取 DNA，使用微量分光光度计对提取好的 DNA 的浓度进行检测，置于-20 ℃冰箱保存。

1.4 PCR 扩增

PCR 扩增反应总体积 10 μL，含 1 μL DNA（60 ng·μL^{-1}），0.2 μL dNTPs，上下游引物各 0.25 μL，1 μL 的 10×PCR Buffer，0.1 μL 的 Taq DNA Polymerase（5 U • μL^{-1}），7.2 μL 的 dd H_2O ，扩增反应在 PCR 仪上进行。扩增程序为 94 ℃预变性 4 min，94 ℃变性 15 s，58 ℃ 复变性 15 s，72 ℃ 延伸 30 s，25 个循环；72 ℃ 延伸 20 min，12 ℃保存。

1.5 扩增产物的检测

用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增产物，在 240 V 恒压下电泳（一般为 50~55 min），可根据溴酚蓝指示剂的位置调整电泳时间。将凝胶用 dd H_2O 清洗 2 次后，在固定液中固定 10 min，随后取出凝胶用蒸馏水清洗 2 次，每次清洗 2 min，再将凝胶放入 0.15% $AgNO_3$ 溶液中染色 6~7 min，用 dd H_2O 清洗 2 次，每次 2 min，随后将凝胶放入显影液中至条带清晰，用 dd H_2O 清洗 2 次后读带并拍照。

1.6 数据统计与处理

用人工读带的方法读取条带，同一引物扩增产物中用 A，B，C……按条带长度从大到小进行编号，利用 Popgene 1.32 软件计算 30 份样品的遗传多样性指数。

计算所用 SSR 引物的 *PIC*（Polymorphism information content）（杨国忠，2004）公式如下。

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum 2P_i^2 P_j^2 \quad (1)$$

式中：*PIC* 为多态信息含量；P_i 和 P_j 分别为第 i 个和 j 个等位基因频率，n 为等位基因数。

引物的有效扩增率为能够有效扩增的引物的数量与引物总数量的比值。

2 结果与分析

2.1 香合欢转录组中 SSR 重复单元类型

通过对香合欢 9 个样本进行 RNA 转录组测序获得 33 335 个 SSR 位点，对 SSR 的重复基元类型进行统计，发现主要有单核苷酸和二至六核苷酸等 6 种重复基元类型（表 2）。其中单核苷酸重复类型占 SSR 位点总数的 64.73%，二核苷酸重复类型占 SSR 位点总数的 20.64%，三核苷酸重复类型占 SSR 位点总数的 12.30%，四至六核苷酸重复类型分别占 SSR 位点总数的 1.62%、0.28%、0.42%。

由表 2 可以看出，在单核苷酸重复类型中 T/A（45.07%）最多，A/T（44.73%）稍次之；二核苷酸重复类型中出现频率最高的为 AT(16.97%)，其次是 TA(14.34%)和 AG/CT(12.42%)；三核苷酸重复类型中 AAT/ATT（4.85%）出现的频率最高，GAA/TTC（4.59%）和 TTC/GAA

（4.24%）稍次之；四核甘酸重复类型中 AAAT/ATTT（9.98%）出现的频率最高，其次为 TTTA/TAAA（9.06%）。核苷酸重复类型一共有 399 种，除去单核苷酸重复类型的四种，二核苷酸重复类型、三核苷酸重复类型、四核苷酸重复类型、五核苷酸重复类型、六核苷酸重复类型分别有 12、60、123、65、135 种。

SSR 的重复次数在 5~68 之间（表 3）。其中，5~11 次重复最多，占 SSR 位点总数的 54.95%；12~18 次重复排在第二位，占 SSR 位点总数的 34.48%；19~25 次重复占 SSR 位点总数的 7.74%；重复次数高于 25 数量较少，仅占总位点数量的 2.83%。在所有重复次数中，10 次重复最多有 5 792（17.38%）个，其次为 11 次重复和 6 次重复，分别有 3 441 个（10.32%）和 2 926 个（8.78%）。

表 2 香合欢转录组中 SSR 重复单元的分布特征

Table 2 Distribution of the SSR repeat motifs in *Albizia odoratissima* transcriptome

核苷酸重复类型 Type of repeat	SSR 数量 No. of SSR	所占比例 Percentage (%)	主要重复基元（数目） Main repeat motif （Number）
单核苷酸 Monucleotide	21 578	64.73	T/A（9 726） A/T（9 652）
二核苷酸 Dinucleotide	6 882	20.64	AT/AT（1 168） TA/TA（987） AG/CT(855)
三核苷酸 Trinucleotide	4 099	12.30	AAT/ATT（199） GAA/TTC（188） TTC/GAA（174）
四核苷酸 Tetranucleotide	541	1.62	AAAT/ATTT（54） TTTA/TAAA（49）
五核苷酸 Pentanucleotide	95	0.28	AAAAT/ATTTT（8） AAAAG/CTTTT（8）
六核苷酸 Hexanucleotide	141	0.42	GCCACC/GGTGGC（2） TGCCGC/GCGGCA（2）
总数 Total	33 335		

表 3 SSR 重复次数

Table 3 SSR repetitions

重复次数 Repetitions	5~11 次 5-11 times	12~18 次 12-18 times	19~25 次 19-25times	>25 次 >25 times
数量 Number	18 317	11 493	2 581	944
所占比例 Percentage (%)	54.95	34.48	7.74	2.83

2.2 香合欢 EST-SSR 引物的有效性

从表 4 可以看出，在 243 对香合欢 EST-SSR 引物中，有 155 对能够在香合欢中有效扩增。且不同核心重复类型的 EST-SSR 引物的有效扩增率有所不同，其中三核苷酸重复类型引物的扩增成功率（66.34%）高于五核苷酸重复类型（64.71%）和四核苷酸重复类型（61.11%）的 EST-SSR 引物。

表 4 香合欢 EST-SSR 引物在五个树种中的扩增结果

Table 4 Amplification results of EST-SSR primers of *Albizia odoratissima* in five tree species

SSR 核心类型 Core motif of	引物数目 No. of	有效引物数目 Number of effective primers

SSR	primer pairs	香合欢 *Albizia odoratissima*	黄豆树 *A. procera*	南洋楹 *A. falcataria*	黑木相思 *Acacia melanoxylon*	格木 *Erythrophleum fordii*
三核苷酸 Trinucleotide	101（72）	67	35	43	45	16
四核苷酸 Tetranucleotide	108（76）	66	35	48	45	13
五核苷酸 Pentanucleotide	34（23）	22	13	18	12	7
Total	243	155	83	109	102	36

2.3 SSR 标记多态性信息

243 对引物中，有 37 对能够在香合欢中扩增出多态性条带，多态性比率为 23.87%。筛选出 10 对条带清晰、重复性好、多态性高的引物，对 30 份香合欢种质进行鉴定，结果表明，10 对引物共扩增出 26 条条带（图 1），平均每个引物扩增出 2.6 条。使用 Popgene 1.32 软件分析 10 对引物的多样性指数（表 5），其有效等位基因数的范围为 1.149 7~2.455 7，平均值为 1.816 4；Nei's 基因多样性指数(*H*)的范围为 0.130 2~0.592 8，平均值为 0.420 9；Shannon 指数(*I*)的范围为 0.289 7~0.984 0，平均值为 0.677 1；根据 Botstein et al. (1980)首次提出的 *PIC*>0.5 时，引物具有高度多态性；0.5<*PIC*<0.25 时，引物具有中度多态性；*PIC*<0.25 时，引物具有低度多态性。10 对引物 *PIC* 值的范围为 0.124 9~0.518 4，平均值为 0.351 7，除 AO-130，AO-133 为低度多态性引物外，其他均属于中高度多态性引物，表明所筛选引物可以用于香合欢种质遗传多样性分析和指纹图谱构建。

表 5 10 对引物多态性信息

Table 5 Information on polymorphism of 10 pairs of primers

引物名称 Primer Name	引物序列(5'-3') Primer Sequence(5'-3')	Nei's 基因多样性指数（*H*） Nei's gene diversity（*H*）	Shannon 指数（*I*） Shannon index（*I*）	有效等位基因数 (*Ne*) Effective number of allele(*Ne*)	多态信息含量 (*PIC*) Polymorphism Information Content (*PIC*)
AO-39	F:TAAGAAAAGGCAAGGCATCG R:TTATAGCGTGAGAGTGGGGG	0.592 8	0.984 0	2.455 7	0.518 4
AO-53	F:AGGAGGAGGAGGCGTTGTAT R:TTCAGCTCAGCCCTGATTTT	0.486 1	0.824 0	1.945 9	0.423 4
AO-62	F:TGCCTCACACTACACGCTTC R:GCGTTGCTTGAGGACTAAGG	0.312 8	0.583 8	1.455 1	0.285 6
AO-75	F:ATGCATGAGGAATGGAGGAG R:CCTCTCCTTATGCCTTTCCC	0.515 0	0.823 7	2.061 9	0.424 4
AO-130	F:AGCTCTAAAAGCAGGTGGCA R:GCCTGTGTCATCATCGCTTA	0.130 2	0.289 7	1.149 7	0.124 9
AO-133	F:AGGATTAAGCAAAGCGCTGA R:CGGAGTTGGCAGTGGATATT	0.231 1	0.392 7	1.300 6	0.204 4
AO-166	F:AGCCTGGAGCTGTACAGGAA	0.436 2	0.627 9	1.773 8	0.341 1

	R:CGAACATGAACCACAGATGG				
AO-184	F:TGGGGGAACAGTGGTTATGT	0.517 8	0.872 0	2.073 7	0.451 3
	R:TCTCTGTTCGTCATTCGTCG				
AO-188	F:ATGCAGGTTGCAATCAATCA	0.487 2	0.680 3	1.950 1	0.368 5
	R:TTTGGGAATTGGGGATTACA				
AO-199	F:TCATCAATGTGCTTCCCAAA	0.499 4	0.692 6	1.997 8	0.374 7
	R:AGCTCAAGCAGCTCAGGAAC				
平均值 Mean		0.420 9	0.677 1	1.816 4	0.351 7

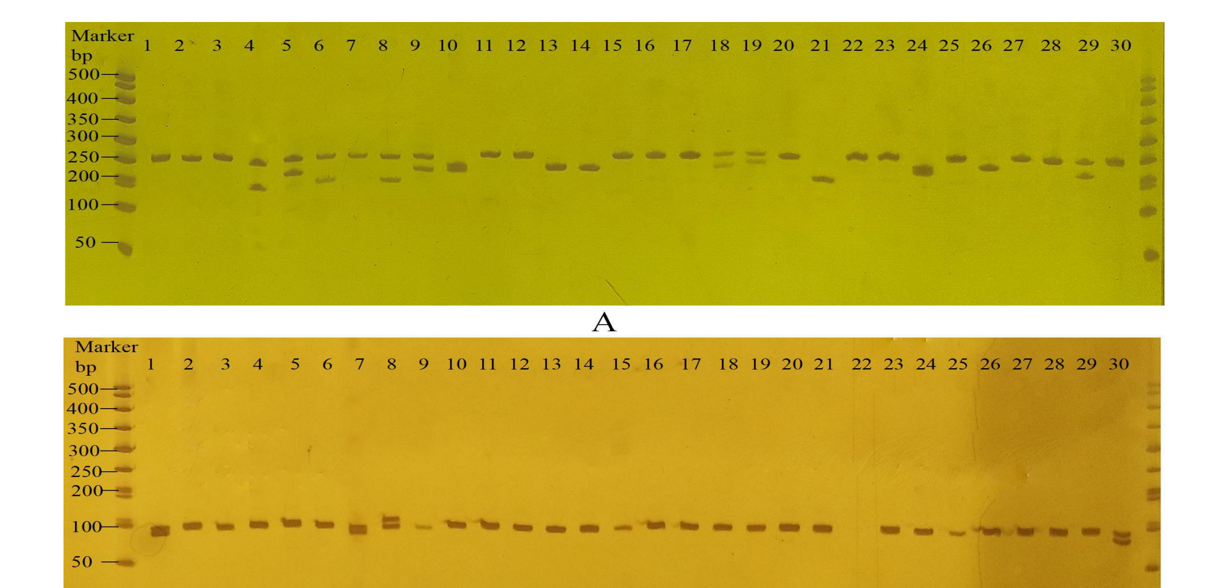


图 1 利用引物 AO-53(A)和 AO-62(B)对 30 份香合欢种质扩增条带胶图

1-30. 供试的 30 份香合欢材料。

1-30. 30 materials tested.

Figure 1 The amplifing bands of 30 *Albizia odoratissima* germplasm using primers AO-53 (A) and AO-62 (B)

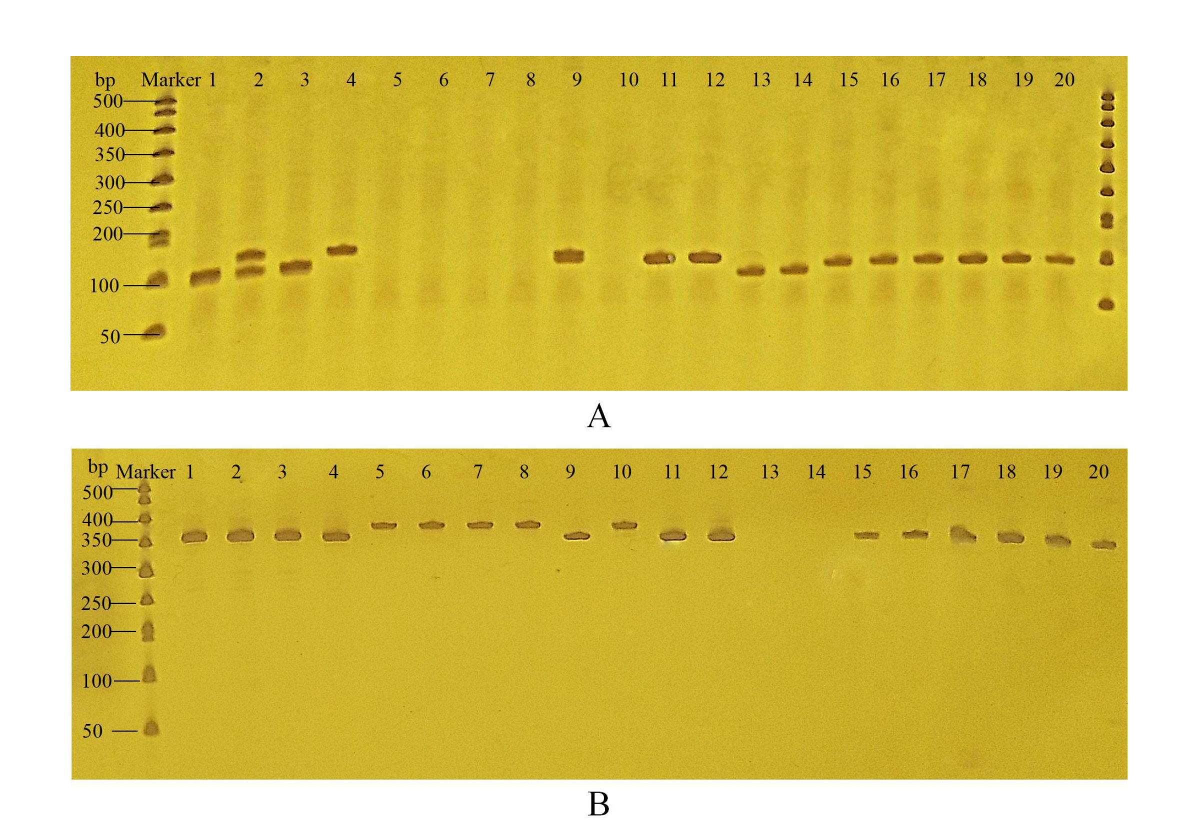
2.4 香合欢 EST-SSR 引物的通用性分析

由表 4 可知，在成功扩增的 171 对引物中，三核苷酸重复类型在黄豆树、南洋楹、黑木相思、格木中的有效扩增率分别为 34.65%、42.57%、44.55%、15.84%；四核苷酸重复类型在黄豆树、南洋楹、黑木相思、格木中的有效扩增率分别为 32.41%、44.44%、41.67%、12.04%；五核苷酸重复类型在黄豆树、南洋楹、黑木相思、格木中的有效扩增率分别为 38.24%、52.94%、35.29%、20.59%。此外，五个树种均通用的引物有 18 对，香合欢、黄豆树、黑木相思、格木特异性标记分别有 26 对、8 对、5 对和 1 对，未发现南洋楹特异性标记。

有 10 对能够在黄豆树中扩增出多态性条带，多态性比率为 12.20%，有 10 对能够在南洋楹中扩增出多态性条带，多态性比率为 9.01%，有 4 对能够在黑木相思中扩增出多态性条带，多态性比率为 3.96%，有 1 对能够在格木中扩增出多态性条带，多态性比率为 2.78%。有 2 对引物能够在 3 个以上树种中扩增出多态性条带。部分引物在各树种的扩增结果见图 2。

香合欢 EST-SSR 引物在香合欢及其他树种的通用性比率三核苷酸重复类型引物平均为

71.29%，四核苷酸重复类型引物平均为 70.37%，五核苷酸重复类型引物平均为 67.65%。可以看出不同核心重复类型的香合欢 EST-SSR 引物的通用性有所不同，三核苷酸重复类型 EST-SSR 引物的通用性比率高于四核苷酸重复类型引物和五核苷酸重复类型引物。



1-4.黄豆树；5-8.格木；9-12.香合欢；13-16.南洋楹；17-20.黑木相思。

1-4. *Albizia procera*; 5-8. *Erythrophleum fordii* ; 9-12. *Albizia odoratissima*; 13-16. *Albizia falcataria*; 17-20. *Acacia melanoxylon*.

图 2 引物 AO-63（A）和引物 AO-196（B）在不同树种的扩增条带图

Figure 2 The amplification bands of primers AO-63(A) and AO-196 (B)in different tree species

3 讨论与结论

3.1 香合欢 EST-SSR 引物的通用性

众多研究表明，在植物中三核苷酸重复类型的 EST-SSR 引物的通用性比率高于其他核心单元重复类型的引物（文明富等，2011；Chen et al., 2005; Li et al., 2008）。本研究中三核苷酸重复类型的香合欢 EST-SSR 引物通用性比率(71.29%)高于四核苷酸重复类型(70.37%)和五核苷酸重复类型引物（67.65%），表明在香合欢中，三核苷酸重复类型 EST-SSR 引物的通用性也最高。

本研究对所设计的 243 对香合欢 EST-SSR 引物进行通用性筛选，发现有效扩增率为 70.37%，这与 Gao et al.（2003），祁雅等（2004）以及魏利斌等（2008）研究指出的，所设计 EST-SSR 引物的有效扩增率应在 60%～90%之间相吻合。其原因可能有以下几个方面：一是实验中所用引物均根据二代测序结果所得，二代测序在拼接过程中可能会存在一些错误，导致引物设计不合理，因而不能有效扩增。二是根据转录组测序结果设计和筛选 EST-SSR 引物时，可能会出现所设计引物 GC 含量过高，形成二聚体或发卡结构等情况，从而影响聚

合酶链式反应使引物不能扩增出有效的目的片段（钟敏，2012）。

本研究中发现在成功扩增出目的条带的 171 对引物中，有 26 对引物在其他四种树种中不具备通用性，这与钟敏等（2012）发现有 216 对引物仅在绿豆种中能够有效扩增的结果相似，其原因可能是这些 EST-SSR 位点为香合欢特有，这些香合欢特异性引物可为香合欢野生种或是近缘物种的分类和鉴别研究提供参考。

SSR 引物的通用性与近缘分类群之间微卫星侧翼序列的保守性和进化过程中微卫星的稳定性息息相关。众多研究表明，基因组编码区序列的保守性高于非编码区，EST-SSR 来源于编码区序列，与功能基因相关，EST-SSR 序列保守性较基因组 SSR 高，因此 EST-SSR 较基因组 SSR 的通用性高，且一般遗传距离越近的物种间引物的通用性越高（洑香香等，2011；Liewlaksaneeyanawin et al., 2004；文明富等，2011）。李春和孙晔（2012）发现 124 对中国板栗多态性 EST-SSR 引物在栲树中通用性和多态性分别为 42.7%和 56.6%。Feng et al.（2014）发现 318 对马尾松 SSR 引物分别有 15 对、10 对和 10 对在湿地松、加勒比松、云南松中扩增出了多态性条带。徐杨等（2016）通过研究也发现云南松 EST-SSR 引物在细叶云南松、马尾松、高山松、油松等近缘物种中具有较高的通用性。本实验中香合欢 EST-SSR 引物在各树种的通用性比率香合欢（63.79%）>南洋楹（45.68%）>黑木相思（41.56%）>黄豆树（33.75%）>格木（14.81%）。其原因可能是黄豆树、南洋楹和黑木相思同属于含羞草亚科（Mimosaceae）植物，而格木为苏木亚科（Caesalpinioideae）植物，黄豆树、南洋楹和黑木相思与香合欢之间的亲缘关系较格木更近，因而同源序列更多，扩增成功率也相对更高。但在南洋楹和黑木相思中的通用性比率高于黄豆树，在一定程度上预示着香合欢与南洋楹、黑木相思的转录组信息更为近似，这与分类学上的亲缘关系远近并不完全一致，此种表型分类学与基因组学上的亲缘差异值得进一步深入探讨。由于本实验所设计引物数量有限，并未包含香合欢全部 EST-SSR 序列，可能会对引物通用性结果造成一定影响。为准确验证引物间的通用性规律，得到更加科学客观的结论，还需做大量研究，今后可在本研究的基础上采用更多引物在同种、同科、同属植物中进行广泛测试。

3.2 香合欢 EST-SSR 引物的多态性

一般来说，EST-SSR 引物的多态信息含量的值会因物种、供试材料数量、以及标记数目的变化而有所不同（魏利斌等，2008）。本研究发现，在香合欢中扩增出多态性条带的引物有 37 对（23.87%），选用 30 份香合欢种质对 10 对多态性高、重复性好的 SSR 引物的多态性进行分析，平均每对引物扩增出多态性条带 2.6 条，仅引物 AO-130 和 AO-133 为低度多态性引物。其原因可能与本研究所用 30 份香合欢种质均为广西百色市隆林县地方种，材料间遗传背景差异较小且材料数量也较少有关。在未来的工作中要加强对不同地域、类型的香合欢种质的搜集和利用。此外，在黄豆树、南洋楹、黑木相思和格木中扩增出多态性条带的引物分别有 10 对（12.20%）、10 对（9.01%）、4 对（3.96%）、1 对（2.78%）。本实验可基本满足香合欢、黄豆树、南洋楹的种质资源遗传多样性等研究需要，若想进一步分析香合欢引物在黑木相思和格木的多态性，可进一步增加筛选引物所用材料的数量，且最好选择不同省份或是不同国家来源的野生群体等差异较大的材料。

目前对于香合欢、黄豆树、南洋楹、黑木相思、格木等豆科高经济价值、生态效益树种的基因信息的了解和研究还很缺乏，含羞草亚科和苏木亚科分子遗传方面的研究较之其他研究方面也还处于落后状态，本研究获得的通用性引物将为继续深入开展香合欢遗传多样性与种质资源保护等研究提供帮助，也将进一步促进香合欢的一些近缘物种甚至一些远缘物种尤其是黄豆树、南洋楹、黑木相思、格木 4 个树种的种质资源的收集、保护、鉴定、遗传多样性分析等研究的开展。

参考文献：

BOTSTEIN D, WHITE RL, SKOLNICK M, et al.，1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Hum Genet, 32 (3): 314-331.

CAI YM, 1996. Dictionary of Chinese medicine names[M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press: 246. [蔡永敏，1996. 中药药名辞典[M]. 北京：中国中医药出版社：246.]

CHEN HM, LI LZ, WEI XY, et al.， 2005. Development, chromosome location and genetic mapping of EST-SSR markers in wheat [J]. Chin Sci Bull, (20): 74-82.

FANG SS, XIE XF, QI JM, et al.， 2018. Universality of simple sequence repeat(SSR) markers from *Cotton (Gossypium hirsutum)* to *Kenaf (Hibiscus cannabinus)* [J]. Chin J Trop Crops, 39 (7): 1373-1382. [方书生，谢雄峰，祁建民，等，2018. 棉花 SSR 标记在红麻中的通用性[J]. 热带作物学报，39(7)：1373-1382.]

FU XX, ZHAO H, WANG Y, 2011. Species identification and genetic relationship assessment of *Pinus* (Sect. *Pinus*) related species based on morphological and molecular markers [J]. Sci Sil Sin, 47 (10): 51-58. [洑香香，赵虎，王玉，2011. 松属近缘种形态和分子鉴定及其亲缘关系探讨[J]. 林业科学，47(10)：51-58.]

FENG YH, YANG ZQ, WANG J, et al.， 2014. Development and characterization of SSR markers from *Pinus massoniana* and their transferability to *P. elliottii*, *P. caribaea* and *P. yunnanensis* [J]. Genet Mol Res, 13(1): 1508-13.

JIANG SY, 2003. Research on tropical agricultural development in Guangxi [M]. Beijing: China Price Press: 241-243. [蒋升湧，2003. 广西热带农业发展研究[M]. 北京：中国物价出版社：241-243.]

LIEWLAKSANEEYANAWIN C, RITLAND CE, EL-KASSABY YA, et al.， 2004. Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs [J]. Theor Appl Genet, 109(2): 361-369.

LI C, SUN Y, 2012. Transferability analysis of EST-SSR markers of castanea mollissimato castanopsis fargesii [J]. Guihaia, 32(3): 293-297. [李春，孙晔，2012. 中国板栗 EST-SSR 分子标记在栲树中的通用性分析[J]. 广西植物，32(3)：293-297.]

LI LZ, WANG JJ, GUO Y, et al.， 2008. Development of SSR markers from ESTs of gramineous species and their chromosome location on wheat [J]. Prog Nat Sci, 18: 1485-1490.

GAO LF, TANG JF, LI HW, et al.， 2003. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches[J]. Mol Breed, 12(3): 245-261.

MENG YH, XU GB, LU MZ, et al.， 2020. Population genetic structure and demographic history of *Disanthus cercidifolius* var. *longipes* [J]. Sci Sil Sin, 56(7): 55-62. [孟艺宏，徐刚标，卢孟柱，等，2020. 长柄双花木种群遗传结构及种群历史[J]. 林业科学，56(7)：55-62.]

POWELL W, MACHRAY GC, PROVAN J, 1996. Polymorphism re-vealed by simple sequence repeats [J]. Trends Plant Sci, 1(7): 215-222.

PREETHI P, RAHMAN S, NAGANEESWARAN S, et al.， 2020. Development of EST-SSR markers for genetic diversity analysis in coconut (*Cocos nucifera* L.) [J]. Mol Bio Rep, 47(12): 9385-9397.

SOOK J, ALBERT A, CHRISTOPHER J, et al.， 2005. Frequency, type, distribution and annotation of simple sequence repeats in Rosaceae ESTs[J]. Funct Integr Genomics, 5(3): 136-143.

TAUTZ D, 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers [J]. Nucleic Scids Res, 17 (16): 6463-6471.

WEI SX, LIANG RL, LIN JY, et al.， 2020. Geographical distribution and community characteristics of *Albizia odoratissima* in China [J]. Guangxi For Sci, 49 (1): 71-75. [韦铄星，梁瑞龙，林建勇，等，2020. 香合欢在中国的地理分布和群落特征[J]. 广西林业科学，49(1)：71-75.]

WANG DD, YANG DX, 2017. Development and transferability of EST-SSR primers in *Actinidia arguta* [J]. J NW For Univ, 32 (4):147-152. [王丹丹，杨东霞，2017. 软枣猕猴桃 EST-SSR 引物开发及通用性研究[J]. 西北林学院学报，32(4)：147-152.]

WEN MF, CHEN X, WANG HY, et al.， 2011. Transferability analysis of cassava EST-SSR and genomic-SSR markers in jatropha and rubber tree [J]. Acta Agron Sin, 37 (1): 74-78. [文明富，陈新，王海燕，等，2011. 木薯基因组 SSR 和 EST-SSR 在麻疯树和橡胶树中的通用性分析[J]. 作物学报，37(1)：74-78.]

WEI LB, ZHANG HY, ZHENG YZ, et al.， 2008. Development and Utilization of EST-derived microsatellites in Sesame (*Sesamum indicum* L.) [J]. Acta Agron Sin, 2008, 34(12):2077-2084. [魏利斌，张海洋，郑永战，等，2008. 芝麻 EST-SSR 标记的开发和初步研究[J]. 作物学报，2008，34(12)：2077-2084.]

XU Y, DENG LL, ZHOU L, et al.， 2016. The Transferability analysis of microsatellite markers from expressed sequence tags of *Pinus yunnanensis* to its close related species [J]. J SW For Univ(Nat Sci Ed), 36 (1): 16-20. [徐杨，邓丽丽，周丽，等，2016. 云南松 EST-SSR 引物在其近缘种中通用性的研究[J]. 西南林业大学学报，36(1)：16-20.]

XIN Y, CUI HR, ZHANG ML, et al.， 2005. Development of EST(ex-pressed sequence tags) marker in Chinese cabbage and its transferability to rapeseed[J]. Hereditas, 27(3): 410-416. [忻雅，崔海瑞，张明龙，等，2005. 白菜的 EST 标记及其对油菜的通用性[J]. 遗传，27（3）：410-416.]

YANG GZ, ZHANG JB, ZHAO YM, et al.， 2004. Study on polymorphism of 8 microsatellite markers in glassland red cattle crossed population[J]. Grass Feeding Livestock, 124(3): 23-27. [杨国忠，张嘉保，赵玉民，等，2004. 8 种微卫星 DNA 标记在草原红牛杂交群体中多态性的研究[J]. 草食家畜，124(3)：23-27.]

ZHANG LD, TANG KX, 2010. Development of plant EST-SSR markers and its application [J]. Genom and App Biol, 29 (3): 534-541. [张利达，唐克轩，2010. 植物 EST-SSR 标记开发及其应用[J]. 基因组学与应用生物学，29(3)：534-541.]

ZHONG M, CHENG XZ, WANG LX, et al.， 2012. Transferability of *Mungbean* Genomic-SSR markers in other *Vigna* species [J]. Acta Agron Sin, 38 (2): 223-230. [钟敏，程须珍，王丽侠，等，2012. 绿豆基因组 SSR 引物在豇豆属作物中的通用性[J]. 作物学报，38(2)：223-230.]

ZHANG YM, LI JF, LU ZW, et al.， 2020. Transferability analysis of sisal EST-SSR markers in *Yucca* and *Furcraea vent* [J/OL]. Chin J Trop Crop: 1-9. [张燕梅，李俊峰，鹿志伟，等，2020. 剑麻 EST-SSR 在丝兰麻和中美麻中的通用性分析[J/OL]. 热带作物学报： 1-9.]

ZHANG Y, WANG QM, YE YY, et al.， 2019. Development and transferability analysis of EST-SSR primers in peach [J]. Mol Plant Breed, 17 (7): 2264-2269. [张勇，王清明，叶宇芸，等，2019. 桃 EST-SSR 引物的开发及通用性分析[J]. 分子植物育种，17(7)：2264-2269.]